Таблица

Биохимические свойства выделенных культур C. jejuni

№ культуры		Тесты		
		оксидаза	каталаза	гиппурат натрия
Михайловская птицефабрика	1	+	+	+
Царевщенская птицефабрика	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
5		+	+	+
Контроли 1 и 2 (музейные штаммы из НИИ им. Пастера, г. Санкт-Петербург)		+	+	+

Обозначение: (+) – положительный тест.

а именно, одна культура с Михайловской птицефабрики и 4 – с Царевщенской птицефабрики по морфологическим, культуральным, тинкториальным и биохимическим свойствам не отличались от контрольных музейных штаммов Campylobacter jejuni, штаммы из НИИ им. Пастера, г. Санкт-Петербург. На основании этого сделан вывод о принадлежности выделенных культур к Campylobacter jejuni.

Можно сделать заключение, что в Саратовской области впервые выделены 5 штаммов C. jejuni от кур с Михайловской птицефабрики Татищевского района и Царевщенской птицефабрики Балтайского района.

Литература

1. Сичинский Л. А. Кампилобактериозы. Этиология и лабораторная диагностика. Ж. Здравоохранение Молдавии, 1991 г., №2, С. 51-55.
2. Иванов С.И. Письмо. О мерах по совершенствованию эпиднадзора за кампилобактериозами от 16.04.04 г. №1100/1067-04113.
3. Сафонова Н.В., Хазенсон Л.Б., Чайка Н.А. и др. Методические рекомендации. Этиология, клиника и диагностика кампилобактериоза. Ленинград, 1988. 23 с.
4. Партин О. С., Грачева Н. М., Щербаков Клинико-патогенетические аспекты кампилобактериоза. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского, ж. Лечащий Врач, Москва.
5. Кирьянов Е.А. Кампилобактериоз животных: Лекция /Приморский с.-х. ин-т. Уссурийск, 1992. 23 с.

УДК: 619:579.869.1

М.Н. Болотский

(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ))

ИНДИКАЦИЯ LISTERIA MONOCYTOGENES В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ИФА

В последнее время среди зооантропонозов, вызывающих токсикоинфекции, особое место занимает листериоз, возбудителем которого является Listeria monocytogenes. Данный микроорганизм относят к эмерджентным зоонозным пищевым патогенам. Бактерии рода Listeria обладают достаточно высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, они чрезвычайно лабильны, способны к длительному сапрофитическому существованию и размножению во внешней среде при низких температурах. [3].

Основной резервуар различных видов листерий - теплокровные животные и окружающая их среда. Возбудитель листериоза размножается и длительное время сохраняется в почве. В воде листерии выжи-

вают в зависимости от величины pH, жесткости воды и концентрации кислорода. На животноводческих фермах главным фактором передачи инфекции крупному рогатому скоту и свиньям является корм. Часто животные болеют бессимптомно и через клинически здоровых особей, выделяющих бактерии с фекалиями, может инфицироваться продовольственное сырье животного происхождения, а затем и конечный продукт. Еще одним важным фактором передачи листерий являются грызуны, контаминируя корм, воду, продовольственное сырье и продукты [5].

Современные технологии переработки и хранения пищевых продуктов создают условия для контаминации и размножения листерий в продуктах питания, что приводит к эпидемическим вспышкам и спорадическим случаям листериоза [6].

Отмечены случаи заболевания человека листериозом в результате употребления таких пищевых продуктов, как салат из сырых овощей, пищевых продуктов, приготовленных с нарушением технологии или прошедших недостаточную термическую обработку (колбасные изделия, сырое молоко, мягкие сыры). Способность размножаться при температуре от 3° С, дает возможность листериям размножаться в пищевых продуктах, хранящихся в холодильнике [1] .

По данным американских ученых в 85% случаях заражение человека листериозом происходит через контаминированные листериями пищевые продукты, причем 50% этих случаев приходится на продукты из мяса и птицы [4] .

Многолетние международные наблюдения показали, что до 12% сыров контаминированы листериями, хотя уровень их содержания достаточно низкий.

Присутствие листерий на тушах, как правило, связывают с фекальным поверхностным загрязнением. В мясных продуктах выживаемость листерий зависит от технологии обработки.

Многочисленными исследованиями показано, что до 50% тушек бройлеров могут содержать листерии на своей поверхности. Как правило, контаминация тушек происходит при обработке птицы, процессах их переработки за счет контакта с контаминированными поверхностями оборудования. Листерии обнаруживались в воде, используемой в технологическом процессе, на руках и перчатках работниц конвейера в убойном цехе.

Сточные воды животноводческих и птицеводческих ферм, мясо – и птицеперерабатывающих предприятий могут контаминировать водные пространства, с чем связана возможная и установленная в ряде случаев контаминация листериями рыбы, а также морепродуктов.

В настоящее время лаборатории, проводящие исследования пищевых продуктов на наличие листерий, руководствуются ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий L.monocytogenes ». При этом выделение L.monocytogenes и окончательная идентификация выделенного патогена может составлять по времени до 14 суток, что осложняет исследование продуктов с ограниченным сроком годности. Наибольший интерес в лабораторной практике представляют ускоренные методы, такие как ИФА, ПЦР, ДНК-ДНК и ДНК-РНК – гибридизация, радиоиммунологические методы исследования, использование хромогенных питательных сред [2]. К достоинствам этих методов следует отнести их высокую чувствительность и специфичность, кроме того, их применение существенно сокращает время анализа, расход питательных сред и трудозатраты.

Целью нашей работы было испытание тест-системы LOCATE® Listeria (производство R-Biopharm Rone Ltd, Германия, предоставленая ООО «Стайлаб»), предназначенной для ускоренного определения листерий в пробах продовольственного сырья, кормов и пищевых продуктов методом иммуноферментного анализа (ИФА).

В этой системе используются высокоспецифичные моноклональные антитела к термостабильным О-антигенам или соматическим антигенам клеточной стенки листерий, которые выявляются после культивирования исследуемых проб в средах обогащения.

Процедура анализа материала с помощью тест-системы LOCATE® Listeria включает обогащение исследуемых проб в соответствующих жидких селективных средах, термическую дезактивацию смешанных культур и постановку ИФА в планшетах. Дезактивированный материал помещают в лунки микротитровального планшета, в процессе инкубации антигены искомых бактерий иммуносорбируются на поверхности лунки. После промывки от несвязавшихся компонентов в лунки вносят конъюгат, представляющий собой моноклональные антитела к листериям, меченные ферментом. В случае присутствия в материале искомых бактерий на поверхности образуется иммунный комплекс.

Лунки вновь промываются и в них вносится субстрат, который в присутствии связанного конъюгата, изменяет цвет с прозрачного на голубой.

Чувствительность испытуемой тест-системы определяли в опытах с десятикратными разведениями гомологичных культур листерий от 10 до 107 клеток/мл. Специфичность диагностической тест-системы устанавливали в опытах с гетерологичными культурами микроорганизмов из семейства Enterobacteriaceae.

Возможность использования диагностической тест-системы для выявления листерий в продовольственном сырье животного происхождения и продуктах питания оценивали в опытах с искусственно контаминированными объектами. С этой целью в пробы мясного фарша, колбасных изделий, рыбы массой 25 г вносили по 1 мл суточной культуры L. monocytogenes с концентрацией бактерий от 10 до 106 м. к/мл.

Порядок исследования материала на наличие L. monocytogenes включал предобогащение в половинном бульоне Фразера в течение 18-24 часов при 30° С.

Затем смешивали 0,1 мл пробы и 10 мл бульона Фразера и также инкубировали 18-24 часа при 30° С. После окончания инкубации пробу тщательно перемешивали и переносили 1 мл в пробирку и прогревали на водяной бане при 80° С в течение 20 минут. Охлажденные до комнатной температуры пробы использовали для постановки ИФА.

Постановка ИФА с использованием тест-системы LOCATE® Listeria осуществлялась следующим образом. Из фольгированного пакета извлекали необходимое число лунок – по одной лунке на каждую пробу и 2 лунки для контроля. В лунки вносили по 100 мкл исследуемых проб, положительного и отрицательного контроля. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. С помощью пипетки заполняли лунки готовым моющим буфером (примерно по 250 мкл на лунку), направляя струю буфера на донышко лунки, переворачивали планшет и стряхивали жидкость. Процедуру повторяли трижды и затем промывали лунки дистиллированной водой. В лунки планшеты вносили по 100 мкл коньюгата. Инкубировали планшет в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем промывали лунки как указано выше. В каждую лунку вносили по 100 мкл субстрата и инкубировали планшет в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Для визуальной интерпретации производили считывание результатов после инкубации. Положительный контроль – синий цвет содержимого лунки. Отрицательный контроль – прозрачный или бледно-голубоватый цвет содержимого лунки. Проба считалась положительной, содержащей L. monocytogenes при следующих условиях:

лунка с отрицательным контролем прозрачная или бледно-голубоватая, лунка с положительным контролем гораздо интенсивнее окрашена в синий цвет;

лунка с исследуемой пробой окрашена в синий цвет интенсивнее, чем лунка с отрицательным контролем, но не обязательно также интенсивно, как лунка с положительным контролем.

Проба считалась отрицательной (в материале отсутствуют L. monocytogenes) при следующих критериях оценки:

лунка с отрицательным контролем прозрачная или бледно-голубоватая;

лунка с положительным контролем интенсивно окрашена в синий цвет;

лунка с исследуемой пробой окрашена так же, как с отрицательным контролем или бледнее.

Результаты исследования. Тест-система для ускоренного определения листерий LOCATE® Listeria продемонстрировала строгую специфичность и выявляла только Listeria monocytogenes .

Положительный результат ИФА отмечен только с культурой L. monocytogenes. Компоненты тест-системы не реагировали с гетерологичными культурами: сальмонеллы, эшерихии, протей, цитробактер, иерсинии , а также Listeria innocua.

Чувствительность тест-системы LOCATE® Listeria в опытах с разведениями чистой культуры составила 106 м.к/ мл. В образцах мясного фарша, колбасных изделий, рыбе, искусственно контаминированных L. monocytogenes, искомые бактерии выявляли при минимальном содержании 102 клеток в пробе.

При проведении мониторинговых исследований с помощью тест-системы LOCATE® Listeria нами было установлено наличие Listeria monocytogenes в пробе замороженного мяса птицы, что было подтверждено результатами бактериологического анализа согласно ГОСТ Р51921-2002.

Заключение

Перспектива метода ИФА с использованием испытанной тест-системы LOCATE® Listeria при проведении скрининговых, сертификационных исследований основывает-

ся на высокой чувствительности, строгой специфичности, результативности и быстроте анализа. Время исследования сокращается до 2-х суток, что особенно актуально при исследовании продуктов с ограниченным сроком годности.

SUMMARY

The results of our experiments on approbating the LOCATE® Listeria test-system to detect Listerya in the foods with ELISA are presented in the paper. LOCATE® Listeria sensitivity in experiments was found to be 102 microbial cells/ml. The test system being used in the experiments with the various Enterobacteriaceae representatives proved to have a high specifity and reduce the experimental period up to 48 hrs.

Литература

1. Бакулов И.А. Основные вехи изучения листериоза животных и людей. Материалы международного симпозиума «Листериоз на рубеже тысячелетий». Покров.1999 250 с
2. Карликанова Н.Р., Куваева И.Б., Карликанова С.Н. Листерии в молоке и молочных продуктах. Москва-Углич. 1999 123 с
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева В.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех. 2002 195 с
4. НАССР/ХАССП Системы анализа рисков и определения критических контрольных точек - Государственные стандарты США и России. ВНИИС. Москва. 2002-300с
5. Куликовский А.В. Эмерджентные пищевые зоонозы.М., изд-во «Крафт+»,2004,174 с.
6. Макаров В.В., Смирнов А.М., Сочнев В.В., Алиев А.А. Эмерджентность, черезвычайные ситуации и зоонозы. Ветеринарная патология, № 3 (10), 2004, с.36-45.

А.С. Малоголовкин, Г.А. Надточей, О.Н. Жигалева, В.Г. Бурдинский, М.Б. Новикова

(Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко (г. Москва), Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии (г. Покров))

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Введение

В инфекционной патологии свиней немаловажное значение имеют недавно получившие широкое распространение болезни, ассоциированные с цирковирусами.

Первые упоминания о цирковирусах свиней (ЦВС) появились в 1991 г., когда в Канаде было выявлено новое заболевание – синдром послеотъёмного мультисистемного истощения (СПМИ). Эту болезнь наблюдали у поросят 6-14 недельного возраста, сопровождающуюся истощением, одышкой, диареей, желтушностью кожи.

В настоящее время СПМИ широко распространён во всех странах мира с развитым свиноводством и причиняет значительный экономический ущерб. Заболеваемость молодняка составляет от 5 до 20%, а в некоторых хозяйствах – 50-70%. Летальность при данном заболевании довольно высока и может достигать 80 -100% [1]. В России цирковирусы свиней впервые были выявлены в 2000 г. [3].

Цирковирусы свиней содержат односпиральную кольцевую ковалентнозамкнутую молекулу ДНК и относятся к роду Circovirus семейства Circoviridae. К цирковирусам свиней относят ЦВС типа 1 и ЦВС типа 2.

ЦВС типа 1 был обнаружен в 1974 г. и получил широкое распростанение в Северной Америке и странах Западной Европы. ЦВС типа 1 является нецитопатогенным контаминантом перевиваемой культуры клеток почек поросят PK-15.

ЦВС типа 2 открыт в 1991 г. Ticher I. (Канада) и был признан первичным этиологическим агентом СПМИ у поросят. Однако существуют данные о наличии ЦВС типа 2 при таких заболеваниях как конгенитальный тремор и дерматит и синдром нефропатии (ДСНП) [1, 2, 4].

Особенно остро в настоящее время встает вопрос о дифференциальной диагностике ЦВС обоих типов между собой и от возбудителей других болезней. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет намного облегчить и ускорить идентификацию инфекционных агентов [3].

В связи с этим задачей данных исследований было усовершенствование отдельных